Mode d'emploi de la HPLC

Mise en route

① Mettre sous tension les trois appareils : Pompe, Détecteur et Imprimante (dans cet ordre)
② Ouvrir (dévisser) la valve de By-Pass (robinet en aluminium en bas à droite de la pompe)
③ **Sur la pompe**, appuyer sur le bouton MANUAL SET, appuyer sur 1 (flush) puis appuyer sur ENTER
④ Appuyer sur PUMP puis sur PURGE. La pompe se met en route à fort débit, vérifier l'évacuation afin de chasser toutes les bulles d'air qui pourraient se trouver dans les tubulures.
Appuyer alternativement sur les boutons A et B de manière à nettoyer les deux voies
⑤ Une fois toutes les bulles chassées, appuyer sur PURGE pour terminer la purge. Revisser la valve de By-Pass de manière à diriger le flux vers la colonne
⑥ **Sur l'imprimante**, appuyer sur CHART SPEED, fixer la valeur à 5 mm/min puis appuyer sur ENTER
⑦ Appuyer sur PLOT ATT, fixer la valeur à 9 puis appuyer sur ENTER
⑧ Appuyer sur INTEG PARAM, puis avec la flèche droite choisir noise et valider avec ENTER ; il s'agit du seuil minimal à partir duquel l'imprimante considère un signal comme étant un pic et l'intègre. Fixer la valeur entre 100 µV et 200 µV en fonction de la concentration de l'échantillon. Valider par ENTER.
⑨ **Sur la pompe**, appuyer sur RUN PROG, vérifier Steps = 1, Prog-No = 2 et Cycles = 1 puis appuyer deux fois sur ENTER ; vérifier que pour l'entrée step = 2, Prog-No est bien égal à 0 puis appuyer sur ESCAPE
⑩ Si la pompe n'est pas déjà en route appuyer sur PUMP. Dans tous les cas, appuyer ensuite sur INIT pour lancer l'équilibrage de la colonne.

Analyse en routine d'un échantillon

① Préparer un échantillon dans un solvant HPLC (DMSO ou MeOH). C ≈ 0,1 à 1 mg/ml ou 0,1-1 mM
② Attendre 15 minutes que la colonne s'équilibre, puis effectuer une mesure du bruit. Pour cela appuyer sur TEST RUN et laisser le temps à l'imprimante d'analyser le signal. Une fois ceci fait, le système est prêt
③ Placer l'injecteur sur la position **LOAD**
④ Insérer l'aiguille de la seringue et injecter le produit (20 à 50 µL) dans la boucle d'injection.
Laisser l'aiguille dans l'injecteur
⑤ Tourner l'injecteur sur la position **INJECT**. Le gradient et l'imprimante démarrent automatiquement.
A ce moment seulement, retirer l'aiguille de l'injecteur
⑥ Deux Bip de 5 s signalent la fin de l'analyse ; **sur l'imprimante** appuyer sur START / STOP pour arrêter le tracé ; après quelques seconde l'imprimante imprime le rapport d'intégration
⑦ Après 3 à 5 minutes la colonne est prête pour une nouvelle analyse. Pour utiliser le même programme, reprendre au point ③ de ce paragraphe, sinon au point ⑨ du paragraphe précédent.

Extinction du système

① **Sur la pompe**, appuyer sur PUMP de manière à éteindre la pompe (la pression doit retomber à 0)
② Eteindre les trois appareils : Imprimante, Pompe, et Détecteur (dans cet ordre)

Solvants

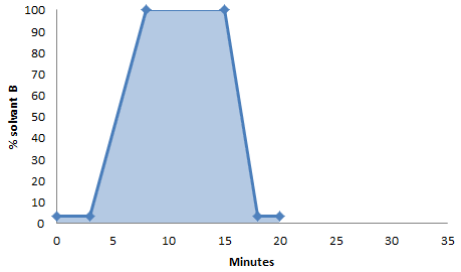
Solvant A : 500 mL d'eau permutée + 168 µL d'acide trifluoroacétique UVSol

Solvant B : 400 mL d'acétonitrile HPLC + 100 mL d'eau permutée + 168 µL d'acide trifluoroacétique UVSol

Les deux flacons doivent avoir été placés au bain d'ultrasons pendant au moins **<u>20 minutes</u>** (dégazage)

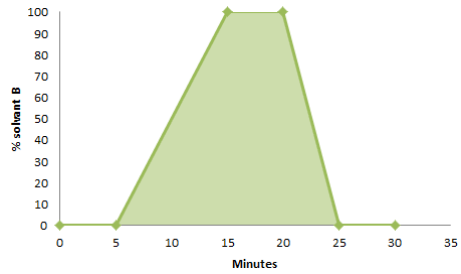
Gradients

<u>Programme N°1 :</u> *produits polaires, temps de rétentions petits, test de pureté ou séparation facile*



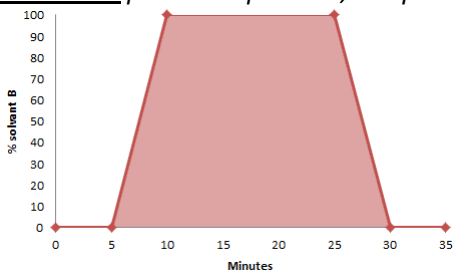
Temps (min)	% solvant B	Débit (mL/min)
0 – 3	3	0.80
3 – 8	100	0.80
8 – 15	100	0.80
15 – 18	3	0.80
18 – 20	3	0.80

<u>Programme N°2 :</u> *standard*



Temps (min)	% solvant B	Débit (mL/min)
0 – 5	0	1.00
5 – 15	100	1.00
15 – 20	100	1.00
20 – 25	0	1.00
25 – 30	0	1.00

<u>Programme N°3 :</u> *produits apolaires, temps de rétention élevés, séparation difficile*



Temps (min)	% solvant B	Débit (mL/min)
0 – 5	0	1.25
5 – 10	100	1.25
10 – 25	100	1.25
25 – 30	0	1.25
30 – 35	0	1.25

Pour une colonne NUCLEODUR C_{18}

Tests

Solution de test : 5 mg de phenol
5 mg de toluène
5 mg de 9,10-Phenanthrenequinone
Diméthylsulfoxyde HPLC, q.s.p. 10 mL

Avec le programme N°2, les temps de rétention doivent être 14.4 min, 17.35 min et 18.63 min